

# 透明质酸摇瓶发酵培养基的优化

黄小忠<sup>1,2</sup>, 曹志杰<sup>2</sup>, 张雪松<sup>2</sup>, 凡军民<sup>2</sup> (1. 南京农业大学生命科学学院, 江苏南京 210095; 2. 江苏农林职业技术学院, 江苏句容 2124002)

**摘要** [目的] 优化透明质酸摇瓶的发酵培养基。[方法] 利用 Plackett - Burman 设计及响应面分析法(RSM)对透明质酸产生菌摇瓶发酵培养基进行优化, 确定影响透明质酸产量的关键因子。[结果] 影响透明质酸产量的关键因子为葡萄糖和酵母膏, 葡萄糖最佳浓度为 55.78 g/L, 酵母膏的最佳浓度为 23.43 g/L; 在此条件下, 发酵液透明质酸的平均产量为 0.219(OD<sub>400nm</sub>)。[结论] 通过对培养基的优化, 透明质酸产量得到提高, 试验值与预测值基本一致。

**关键词** 兽疫链球菌; 优化; 透明质酸; 响应面分析

**中图分类号** S188 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2014)01-00015-02

## Optimization of Hyaluronic Acid Flask Fermentation Medium

**HUANG Xiao-zhong et al** (School of Life Science, Nanjing Agricultural University, Nanjing, Jiangsu 210095)

**Abstract** [Objective] To optimize the flask fermentation medium for hyaluronic acid. [Method] By using Plackett - Burman design and RSM, the flask fermentation medium for hyaluronic acid was optimized, the key factors for influencing the yield of hyaluronic acid were obtained. [Result] The key influencing factors are glucose and yeast extract, the optimum concentrations of them are 55.78 and 23.43 g/L, respectively; under the above condition, the average yield of fermentation liquor hyaluronic acid is 0.219(OD<sub>400nm</sub>). [Conclusion] Through optimization of culture medium, the yield of hyaluronic acid is improved, the test value is basically consistent with the predicted value.

**Key words** *Streptococcus zooepidemicus*; Optimization; Hyaluronic acid; Response surface analysis

透明质酸(Hyaluronic acid, 简称 HA), 又名玻尿酸, 是一种白色无味的纤维状或者无定形物质, 易溶于水。HA 的水溶液呈酸性, 带一定的负电荷。其分子是由 β-D-葡萄糖醛酸和 β-D-N-乙酰氨基葡萄糖的双糖单位反复交替连接而成的高分子物质, 广泛存在于动物组织间质中, 也是链球菌、绿脓杆菌等菌株荚膜的主要成分<sup>[1]</sup>。笔者以兽疫链球菌(*Streptococcus zooepidemicus*)作为透明质酸产生菌, 利用 Plackett - Burman 设计及响应面分析法(RSM)对透明质酸摇瓶发酵培养基进行优化, 详细考察了培养基中葡萄糖和酵母膏浓度对透明质酸产量的影响, 确定其在发酵培养基中的最佳浓度, 以期工业化生产提供理论参考。

## 1 材料与方

### 1.1 材料

**1.1.1 供试菌种。**兽疫链球菌(*Streptococcus zooepidemicus*), 由江苏农林职业技术学院生物工程系实验室保藏。

**1.1.2 主要仪器。**超净工作台, 离心机, 摇床, 分光光度计, 培养箱。

**1.1.3 主要试剂。**十六烷基三甲基溴化铵(CTAB 试液)为分析纯, 市售; 无菌水及去离子水, 实验室自制。

### 1.2 方法

**1.2.1 培养基的制备。**①斜面培养基。葡萄糖 5.0 g/L, 蛋白胨 10.5 g/L, 牛肉膏 5.5 g/L, 酵母膏 7.14 g/L, 酵母粉 2.5 g/L, 磷酸二氢钾 2.0 g/L, 硫酸镁 0.5 g/L, 琼脂 2%, pH 值 7.0, 121 °C 灭菌 25 min<sup>[2]</sup>。②种子培养基。以斜面培养基为基础不添加琼脂。③发酵培养基。蛋白胨 10.5 g/L, 牛肉膏 5.5 g/L, 酵母粉 2.5 g/L, 磷酸二氢钾 2.0 g/L, 硫酸镁 0.5 g/L, pH 值 7.0, 121 °C 灭菌 25 min。葡萄糖及酵母膏取优化

后浓度。

**1.2.2 培养方法。**①菌种活化。取斜面保藏的原始菌种, 接种于新鲜斜面培养基上, 于 37 °C 培养 24 h。②种子培养。取 5 ml 无菌水冲洗斜面, 经离心机 4 500 r/min 离心 10 min, 去上清液; 用无菌水洗涤沉淀 2 次, 重新悬浮于 5 ml 无菌水中, 摇匀后倒入盛有 45 ml 无菌水的 100 ml 三角瓶中, 振荡 10 min; 分别取 45 ml 液体培养基于 250 ml 三角摇瓶, 加上述菌悬液 5 ml, 起始 pH 值 7.0, 转速 250 r/min, 37 °C 下培养 18 h。③发酵培养。取种子液, 接种量 10%, 摇瓶装液量 20%, 转速 250 r/min, 37 °C 下培养 24 h<sup>[3]</sup>。

**1.2.3 测定方法。**取样, 每瓶抽取不少于 6 ml 的发酵液, 于 5 000 r/min 离心 5 min, 去除培养液中的菌体, 小心准确量取 5 ml 清液, 再加入适量的无水乙醇, 在 4 °C 下沉淀 1 h, 再次以 5 000 r/min 离心 5 min, 去上清液, 取沉淀, 准确加入 10 ml 去离子水溶解沉淀, 加入 CTAB 试液, 以接种的培养液经相同处理后为空白对照, 使用分光光度计在 400 nm 波长下测定吸光度, 通过 OD 值来比较 HA 的含量<sup>[4]</sup>。

**1.2.4 菌体量测定。**利用分光光度计, 在波长 660 nm 处测定一定稀释倍数的发酵液的吸光度, 通过 OD 值来评价菌体含量的高低。

**1.2.5 Plackett - Burman 试验确定关键因素。**通过单因子试验, 确定各因素的参照范围, 制定基础发酵培养基配方<sup>[5]</sup>, 试验因素水平编码见表 1, 利用 6 因子 2 水平 Plackett - Burman 设计试验选出摇瓶发酵培养基中的关键因子。

表 1 Plackett - Burman 试验设计的因素水平编码

水平	因素					
	葡萄糖 X <sub>1</sub> //g/L	蛋白胨 X <sub>2</sub> //g/L	牛肉膏 X <sub>3</sub> //g/L	酵母膏 X <sub>4</sub> //g/L	磷酸氢二钾 X <sub>5</sub> //g/L	硫酸镁 X <sub>6</sub> //g/L
-1	10.00	5.00	2.50	4.00	1.00	0.25
+1	20.00	10.00	5.00	8.00	2.00	0.50

**作者简介** 黄小忠(1981-), 男, 江苏海安人, 讲师, 硕士, 从事生物工程研究, E-mail: 523855294@qq.com。

**收稿日期** 2013-12-09

**1.2.6 Box - Behnken 试验设计。**以最大产量区进行 Box - Behnken 设计,因素水平编码见表 2。

表 2 中心组合试验设计的因素水平编码

水平	葡萄糖( $X_1$ )/g/L	酵母膏( $X_2$ )/g/L
-1	50	20
+1	60	24

## 2 结果与分析

**2.1 Plackett - Burman 试验确定关键因素** 由表 3 可知,经过 Plackett - Burman 试验的显著性分析,葡萄糖、酵母膏为显著影响因子(可信度大于 90%,主效应  $p \leq 0.1$ )。因此选取葡萄糖和酵母膏为主要影响因素。

表 3 Plackett - Burman 试验设计与结果

试验号	X1	X2	X3	X4	X5	X6	HA 含量 ( $OD_{400nm}$ )
1	1	1	-1	1	1	1	0.224
2	-1	1	1	-1	1	1	0.128
3	1	-1	1	1	-1	1	0.304
4	-1	1	-1	1	1	-1	0.195
5	-1	-1	1	-1	1	1	0.173
6	-1	-1	-1	1	-1	1	0.163
7	1	-1	-1	-1	1	-1	0.181
8	1	1	-1	-1	-1	1	0.221
9	1	1	1	-1	-1	-1	0.244
10	-1	1	1	1	-1	-1	0.150
11	1	-1	1	1	1	-1	0.249
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	0.063

**2.2 最陡爬坡试验** 根据 Plackett - Burman 试验结果中葡萄糖、酵母膏 2 个主要影响因素浓度的大小,确定最陡爬坡试验的方向和变化步长,同时通过最快的速度靠近最大 HA 产量的区域。其他因子浓度分别为:蛋白胨 10 g/L,牛肉膏 5 g/L,磷酸氢二钾 2 g/L,硫酸镁 0.5 g/L。由表 4 可知,主要因素浓度处在第 8 组试验的条件下,HA 产量最高。故以试验 8 的条件作为响应面设计因素水平的中心点。即葡萄糖、酵母膏的浓度分别为 55 和 22 g/L。

表 4 最陡爬坡路径试验设计与结果

试验号	$X_1$	$X_2$	HA 含量( $OD_{400nm}$ )
1	20	8	0.16
2	25	10	0.13
3	30	12	0.21
4	35	14	0.33
5	40	16	0.28
6	45	18	0.31
7	50	20	0.31
8	55	22	0.35
9	60	24	0.23
10	65	26	0.23

**2.3 响应面法优化 HA 的发酵培养基** 响应曲面法(RSM)广泛应用可以使得产品的开发成本得到大幅的降低,产品生产的工艺得到优化,产品的质量得到提高,尤其对于微生物

发酵条件的优化具有其独特有的优势,除了可以考察各个显著影响因素之间交互作用对优化结果的影响,还能考虑发酵条件中的各种重要影响因素<sup>[6]</sup>。

**2.3.1 二次回归模型拟合及方差分析。**用 SPSS 软件对试验结果进行回归分析和方差分析,进行回归拟合可以得到产量  $Y$  对编码自变量  $X_1$ 、 $X_2$  的回归方程:

$$Y = -5.08726 + 0.11943X_1 + 0.16878X_2 - 0.00175X_1X_2 - 0.000703X_1^2 - 0.00151875X_2^2$$

通过回归方程及方差分析可知,回归模型大于  $F$  值的概率为 0.0002,可以看出此模型的可信度较高。而且,方程中  $X_1$ 、 $X_2$  和  $X_1X_2$  对  $Y$  值都有极显著的影响,表明试验因子对响应值不是简单的线性关系;另外复相关系数  $R^2 = 0.9536$ ,校正后  $R^2 = 0.9204$ ,说明模型可以解释 95.36% 的试验所得的 HA 的变化;最后得到  $E$  值的变异系数  $C.V.\% = 3.5$ ,可以说明该回归模型的可信度较高。

表 5 中心组合试验设计及其结果

试验号	$X_1$	$X_2$	HA 含量( $OD_{400nm}$ )
1	-1	-1	0.149
2	1	-1	0.210
3	-1	1	0.212
4	1	1	0.203
5	-1.41	0	0.146
6	1.41	0	0.211
7	0	-1.41	0.189
8	0	1.41	0.214
9	0	0	0.209
10	0	0	0.216
11	0	0	0.214
12	0	0	0.219
13	0	0	0.219

**2.3.2 响应面分析。**利用 Design - Expert 软件,结合回归方程绘制出响应面分析图及等高线图(见图 1)。响应面图代表 2 个独立变量之间的相互作用,由响应面和相应的等高线可以看出,两因素之间的相互作用都比较明显<sup>[7]</sup>。

为了进一步确定 HA 最大产量的稳定点,对回归方程进行整理,解方程得模型的极值点为  $X_1 = 55.78$  g/L,  $X_2 = 23.43$  g/L,代入回归方程,解得预测 HA 产量为 0.221 ( $OD_{400nm}$ )。经过进一步的验证试验,通过 3 次平行试验,得到发酵液 HA 平均产量为 0.219 ( $OD_{400nm}$ ),与模型的预测值接近,说明该模型能较好地预测实际发酵情况。

## 3 结论

试验结果表明,通过 Plackett - Burman 设计试验和最陡爬坡试验以及 Box - Behnken 设计三者相结合是比较适合于发酵培养基优化的试验设计组合,能快速方便的优化培养基成分以及确定发酵工艺的关键因素。Design - Expert 是一种能方便的进行 Plackett - Burman 设计和响应面优化分析的软件,使用该软件进行数据处理得到的结果比较可靠,能满足相关试验对数据处理的要求。通过该方法对摇瓶发酵培养基的优化,降低了发酵生产透明质酸的成本,为进一步放大

(下转第 23 页)

GST 标签的蛋白以及与其发生相互作用的蛋白,west-blot 检测时加入 ak6 抗体,使 HIS-AK6 融合蛋白与之结合,结果表明抗体是与 ak6 结合而不是与 GST 标签结合,从而证明拟南芥中 fibrillar 蛋白与 ak6 蛋白发生了特异性结合,二者存在相互作用。fibrillar 蛋白在生物体内参与 rRNA 前体的加工,那么可以推测,突变体植株长势矮小,可能是由于 ak6 的缺失,导致 fibrillar 蛋白与其无法融合,影响了 rRNA 的合成,使核糖体的合成发生障碍,影响细胞能量代谢,从而使植株长势矮小。但这仅是推测,结论还有待进一步考证。

试验成功构建了带有 GST 标签的拟南芥中 fibrillar 蛋白的表达载体,在原核生物大肠杆菌中对重组蛋白进行了诱导表达,纯化后得到了 fibrillar 蛋白;通过体外 pull-down 试验证明,拟南芥中的 fibrillar 蛋白与 ak6 蛋白具有相互作用。

### 参考文献

- [1] NODA L H. Adenylate Kinase[M]// BOYER P D. The Enzymes. 3rd Ed. Ed. New York, USA: Academic Press, 1973: 279 - 305.
- [2] MENG G, ZHAI R, CHEN B, et al. Identification and characterization of human adenylate kinase 6 homologues from *Drosophila melanogaster* [J]. *Biochemistry* (Moscow), 2008, 73(1): 38 - 43.
- [3] WHITFORD P C, MIYASHITA O, LEVY Y, et al. Onuchic. Conformational Transitions of Adenylate Kinase: Switching by Cracking [J]. *J Mol Biol*, 2007, 366: 1661 - 1671 .
- [4] VAN ROMPAY AR, JOHANSSON M, KARLSSON A. Identification of a novel human adenylate kinase. cDNA cloning, expression analysis, chromosome localization and characterization of the recombinant protein [J]. *Eur J*

- Biochem*, 1999, 261: 509 - 517.
- [5] ZANCANI M, CASOLO V, VIANELLO A, et al. Involvement of apyrase in the regulation of the adenylate pool by adenylate kinase in plant mitochondria [J]. *Plant Sci*, 2001, 161: 927 - 933.
- [6] ZHAI R, MENG G, ZHAO Y, et al. A novel nuclear - localized protein with special adenylate kinase properties from *Caenorhabditis elegans* [J]. *FEBS Lett*, 2006, 580: 3811 - 3817.
- [7] TSUYOSHI TANABE, MAMORU YAMADA, TAKAFUMI NOMA, et al. Tissue-Specific and Developmentally Regulated Expression of the Genes Encoding Adenylate Kinase Isozymes [J]. *The Journal of Biochemistry*, 1993, 113(2): 200 - 207.
- [8] REN H, WANG L, BENNETT M, et al. The crystal structure of human adenylate kinase 6: An adenylate kinase localized to the cell nucleus [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2005, 102: 303 - 308.
- [9] PETER ROBERT LANGE, CLAUDIA GESERICK, GILBERT TISCHENDORF, et al. Functions of Chloroplastic Adenylate Kinases in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiology*, 2007, 146: 492 - 504.
- [10] JUHNKE H, CHARIZANIS C, LATIFI F, et al. The essential protein *fap7* is involved in the oxidative stress response of *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Mol Microbiol*, 2000, 35: 936 - 948.
- [11] CARRARI F, COLL-GARCIA D, SCHAUER N, et al. Deficiency of a plastidial adenylate kinase in *Arabidopsis* results in elevated photosynthetic amino acid biosynthesis and enhanced growth [J]. *Plant Physiol*, 2005, 137: 70 - 82.
- [12] ZHANG J F, ZHANG F Y, ZHENG X F. Depletion of hCINAP by RNA interference causes defects in Cajal body formation, histone transcription, and cell viability [J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2010, 67: 1907 - 1918.
- [13] TANABE T, YAMADA M, NOMA T, et al. Tissue - specific and developmentally, Regulated expression of the genes encoding adenylate kinase isozymes [J]. *J Biochem*, 1993, 113: 200 - 207.
- [14] NELSON D L, COX M M; *Lehninger principles of Biochemistry* [M]. Third ed. New York; Worth Publishers, 2000: 501.

(上接第 16 页)

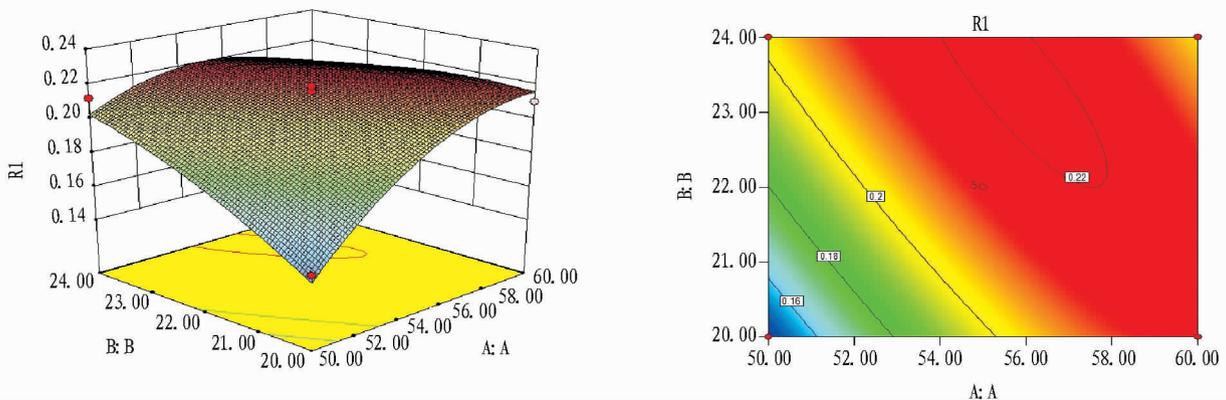


图 1 葡萄糖、酵母膏交互影响的响应面曲面及等高线图

发酵生产奠定了基础。

### 参考文献

- [1] 鲁念慈, 谭天伟. 透明质酸的制备及其应用 [J]. *功能高分子学报*, 2001, 14(3): 370 - 376.
- [2] 黄小忠, 高天响, 张雪松. 透明质酸钠瓶发酵条件的优化 [J]. *江苏农业学报*, 2013, 41(2): 311 - 313.
- [3] 吴明霞, 陈爱萍, 蔡彬新. 透明质酸发酵条件的优化 [J]. *农产品加工 (学刊)*, 2011(6): 45 - 47.
- [4] 陈永浩, 王强. 发酵液中透明质酸含量快速检测方法研究 [J]. *食品与发酵工业*, 2009, 35(1): 134 - 135.

- [5] 欧宏宇, 贾士儒. SAS 软件在微生物培养条件优化中的应用 [J]. *天津轻工业学院学报*, 2001(3): 14 - 17.
- [6] 郝学财, 余晓斌, 刘志钰, 等. 响应法在优化微生物的培养基中的应用 [J]. *食品研究与开发*, 2006, 27(1): 38 - 41.
- [7] 于晓丹, 马霞, 王可, 等. 利用响应面法优化  $\gamma$ -聚谷氨酸发酵培养基 [J]. *中国酿造*, 2010(11): 132 - 134.
- [8] LI J, ZANG J, XIAO L D, et al. Optimization of the Extraction Conditions of Celery Flavonoids by Response Surface Methodology [J]. *Medicinal Plant*, 2012, 3(3): 65 - 67, 70